

519131

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



Rec'd PCT/PTO 22 DEC 2004



(43) Date de la publication internationale
15 janvier 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/004482 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : A23J 1/20,
A23C 9/146, A23L 1/305, A61K 35/20, 38/40, 38/17, 8/98

Jérôme [FR/FR]; 3 rue du Bois Rondel, F-35700 RENNES
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002015

(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; CABINET ORES,
36 rue de Saint Petersburg, F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international : 30 juin 2003 (30.06.2003)

(81) États désignés (national) : BR, CA, JP, KR, PL, US.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02 08234 2 juillet 2002 (02.07.2002) FR

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
PAGNIE LAITIÈRE EUROPEENNE [FR/FR]; F-50890
CONDE SUR VIRE (FR).

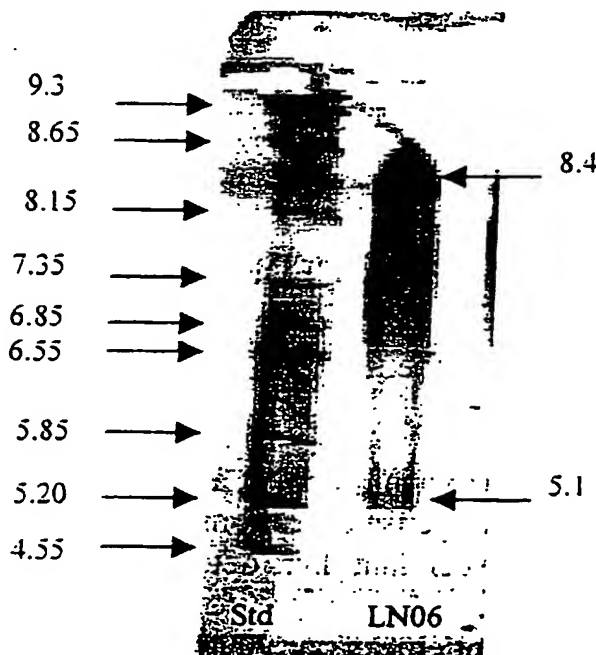
En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : SOUPPE,

(54) Title: MILK PROTEIN ISOLATE AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre : ISOLAT DE PROTEINES DE LAIT ET PROCEDE POUR SA PREPARATION



(57) Abstract: The invention concerns a method for isolat-
ing milk proteins from milk or from whey comprising steps
which consist in passing the milk or whey over a cation-ex-
changing resin, eluting the fraction retained by an aqueous
salted solution and desalting and sterilizing the eluate. The
invention also concerns a milk protein fraction obtained by
said method and its use for preparing pharmaceutical and
food compositions.

(57) Abrégé : L'invention concerne un nouveau procédé
d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un
lactosérum comportant les étapes de passage du lait ou
lactosérum sur une résine échangeuse de cations, éluage
de la fraction retenue par une solution aqueuse salée et
dessalage et stérilisation de l'éluat. Elle a également pour
objet une fraction protéique laitière obtenue par ce procédé
et son utilisation pour la préparation de compositions
pharmaceutiques ou alimentaires.

WO 2004/004482 A1

ISOLAT DE PROTEINES DE LAIT ET PROCEDE POUR SA PREPARATION

La présente invention a pour objet un nouveau procédé d'isolement de protéines de lait, la composition, isolat de protéines de lait ou fraction protéique laitière, en résultant et ses applications, notamment alimentaires et pharmaceutiques.

5 On connaît plusieurs documents de l'art antérieur décrivant la purification de protéines de lait.

Le document EP-253395 décrit l'obtention d'une lactoferrine bovine de haute pureté (>80% en une étape ou >98% en deux étapes) par adsorption de lait ou de lactosérum sur une résine échangeuse de cations comprenant des radicaux carboxyméthyle, puis rinçage et désorption de la lactoferrine.

10 Le document EP-348508 décrit également un procédé de préparation d'une lactoferrine bovine de haute pureté (>95%) par adsorption de lait ou de lactosérum sur une résine échangeuse de cations de type polysaccharide comprenant des fonctions ester d'acide sulfurique et élution par une solution aqueuse de sel.

15 Le document EP-298875 décrit un procédé permettant d'isoler certaines protéines du lactosérum par adsorption sur un support minéral poreux sous forme de grains, ces grains étant recouverts d'une couche de polysaccharide aminé présentant en surface des groupements fonctionnels acides, tels que des groupements carboxyliques ou sulfoniques.

20 Le document EP-418704 décrit un procédé pour purifier séquentiellement la lactoferrine et la lactoperoxydase par élution sur une colonne chargée avec une résine polysaccharide greffée par des groupes acide sulfonique.

Le document US-6,096,870 décrit un procédé de séparation séquentielle de protéines du petit lait par élution sur des résines cationiques.

25 Le document EP-1017286 décrit un procédé de séparation séquentielle de protéines du petit-lait par chromatographie à flux radial.

La lactoferrine et la lactoperoxydase sont des protéines du lait dotées de propriétés intéressantes : leur capacité à lier le fer leur confère un rôle d'agent anti-bactérien contre les bactéries dont le métabolisme requiert d'importantes quantités de fer.

30 La lactoperoxydase est indispensable au marquage protéique par l'iode. La lactoferrine favorise la croissance des lymphocytes et favorise l'absorption du fer par l'organisme, elle régule la différenciation des leucocytes et elle inhibe la peroxydation des lipides.

Toutefois, tous ces documents concernent des procédés visant à obtenir une lactoferrine et/ou une lactoperoxydase les plus pures possibles, c'est-à-dire des

procédés visant à réduire le plus possible la proportion des autres protéines initialement présentes dans le lait ou le lactosérum. En outre, les conditions de fixation de la matière première et d'élution des protéines sont des conditions douces, avec des flux de matières lents. En revanche, l'objectif que s'est fixé la demanderesse est l'obtention d'une fraction

5 protéique laitière comprenant, entre autres constituants, de la lactoferrine et de la lactoperoxydase, mais comprenant surtout une proportion des autres protéines plus élevée que dans le lait ou le lactosérum de départ. Pour cela la demanderesse a mis au point un procédé avec des flux beaucoup plus élevés que ceux décrits dans les documents analysés ci-dessus, ce procédé permettant une fixation plus sélective vis-à-vis de certaines protéines.

10 Le document WO93/13676 divulgue un procédé permettant d'isoler la lactoferrine et la lactoperoxydase par passage sur une résine échangeuse de cations à flux élevé, à partir de petit-lait. Ce procédé se distingue du procédé selon la présente invention par le fait que le flux est plus élevé que dans le procédé selon l'invention (supérieur à 5 m/h) et qu'il vise à purifier la lactoferrine et la lactoperoxydase, et non pas à obtenir une

15 fraction protéique laitière particulière contenant un taux relativement élevé des autres protéines et dotée de propriétés biologiques améliorées.

On connaît également, par le document EP-704218 un agent destiné à renforcer les os, cet agent comprenant une fraction protéique basique ou une fraction peptidique basique, issues du lait et obtenues par passage du lait sur une résine cationique

20 et élution. Toutefois, les conditions d'adsorption et d'élution décrites dans ce document sont distinctes de celles employées dans le procédé selon l'invention et permettent d'isoler une fraction protéique distincte de celle obtenue selon la présente invention.

Les documents JP-8165249, JP-9187250, JP-9294537 et EP-1010430 décrivent des compositions destinées au renforcement des os et/ou de prévention des

25 maladies parodontales, ces compositions comprenant une fraction protéique basique dérivée du lait obtenue par adsorption du lait et élution sur une résine cationique. Toutefois, les conditions d'adsorption et d'élution décrites dans ces documents sont distinctes de celles employées dans le procédé selon l'invention et permettent d'isoler une fraction protéique distincte de celle obtenue selon la présente invention.

30 Ainsi, c'est avec étonnement que la demanderesse a découvert un nouveau procédé d'isolement de protéines de lait permettant d'obtenir une fraction protéique laitière dotée de propriétés biologiques améliorées, notamment une fraction protéique laitière favorisant la croissance des ostéoblastes et l'inhibition de la prolifération des pré-ostéoclastes et des ostéoclastes.

L'invention a pour objet un procédé d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un lactosérum comportant les étapes suivantes :

- a) le lait ou le lactosérum est stérilisé et dégraissé ;
- b) la fraction laitière issue de l'étape a) est passée sur une résine échangeuse de cations conditionnée dans une colonne d'élution ;
- c) la fraction retenue sur la résine est éluée par une solution aqueuse salée ;
- d) l'éluat résultant de l'étape c) est dessalé, de préférence par ultrafiltration, et diafiltration puis stérilisé, de préférence par microfiltration.

Ce procédé étant caractérisé en ce que :

α) la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides fortes ;

le paramètre BV désignant le rapport du volume de matière première au volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre SV désignant le rapport du débit d'alimentation de la colonne au volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre LV désignant le rapport du débit d'alimentation de la colonne à la section de la colonne,

β) au cours de l'étape b), les paramètres de fixation ont les valeurs suivantes :

- BV_f est compris entre 50 et 400, de préférence entre 80 et 300 ;
- SV_f est compris entre 2 et 40 h^{-1} ;
- LV_f est supérieur ou égal à 1 m/h et inférieur ou égal à 5 m/h.

γ) au cours de l'étape c), les paramètres d'élution ont les valeurs suivantes :

- BV_e est compris entre 1,5 et 7 ;
- LV_e est inférieur à 1 m/h, de préférence inférieur à 0,5 m/h.

On peut utiliser comme produit de départ dans le procédé selon l'invention soit du lait, soit du lactosérum, préférentiellement issus de la vache. Le lactosérum est le liquide résiduel obtenu après l'extraction des protéines et de la matière grasse du lait ou du petit-lait. On distingue en général trois catégories de lactosérum. Les deux premières catégories sont classées selon l'acidité du lactosérum qui peut être inférieure ou supérieure à 1,8 g d'acide lactique/l : le lactosérum doux, issu de la

fabrication de fromage à pâte pressée cuite ou non cuite (emmental, saint-paulin etc.) et le lactosérum acide, issu de la caséine ou d'autres fromages obtenus par coagulation mixte ou lactique (pâtes molles, pâtes fraîches). La composition moyenne du lactosérum doux est à titre indicatif, pour 61 g de matières sèches par kg de lactosérum, de 42 à 48 g de lactose, 8 g de protéines, 2 g de graisses, 5 à 7 g de minéraux, 1 à 5 g d'acide lactique et le reste en minéraux et vitamines.

On connaît également le lactosérum idéal obtenu par microfiltration du lait sur un support de porosité moyenne de 0,1 μm .

Selon une première variante de l'Invention, on utilise comme produit de départ du lait, et avantageusement du lait de vache, dont la composition permet, par le procédé selon l'invention, l'obtention d'un isolat de protéines ayant des propriétés biologiques plus intéressantes. Cette variante permet également d'obtenir un rendement en protéines supérieur aux variantes utilisant le lactosérum comme produit de départ.

Selon une seconde variante préférée de l'Invention, on utilise comme produit de départ du lactosérum acide de caséinerie. Cette variante représente un avantage économique important dans la mesure où le produit de départ est un sous-produit issu de l'exploitation industrielle et donc d'un faible coût.

Dans la première étape du procédé, le lait ou le lactosérum sont stérilisés et dégraissés par écrémage, de façon connue :

L'écémage du lait désigne la séparation de la crème du lait, quel que soit le procédé mis en œuvre pour obtenir cette séparation.

De façon traditionnelle, la fabrication de la crème se fait selon un processus naturel : lorsque le lait repose, les éléments qui le composent se séparent en fonction de leur densité. Les globules de matière grasse étant plus légers que l'eau remontent à la surface pour former une couche de crème. En production industrielle, la formation de la crème est accélérée par passage du lait dans une écrémeuse centrifuge.

De façon habituelle, la pasteurisation est faite par un chauffage contrôlé de courte durée de façon à éliminer les germes pathogènes éventuellement présents dans la crème. Avantageusement, la pasteurisation est faite à une température comprise entre 65 et 95°C, préférentiellement entre 80 et 95°C. On peut par exemple traiter le lait ou le lactosérum pendant 15 secondes à une température comprise entre 65 et 82°C. On peut également stériliser le lait ou le lactosérum de départ par microfiltration sur un filtre doté de pores d'un diamètre allant de 0,1 à 2 μm .

La matière première stérile et dégraissée est alors passée sur une résine échangeuse de cations. Selon l'invention la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides fortes et ayant une capacité d'échange d'ions comprise entre 200 et 1000 $\mu\text{E/ml}$, de préférence entre 400 et 700 $\mu\text{E/ml}$. Par fonction acide forte on entend une fonction acide dotée d'un $\text{pKa} \leq 2$. Notamment elle peut être greffée par des fonctions acide sulfonique, généralement sous forme de sels de sulfonate pour leur mise en œuvre, la nature du sel étant déterminée par la solution qui a servi à conditionner la colonne avant la mise en œuvre du procédé. Préférentiellement, on choisit un greffage par des groupements aromatiques ou aliphatiques porteurs de fonctions acide sulfonique, encore plus préférentiellement sous forme de sels de propyl sulfonate. La résine sur laquelle sont greffées les fonctions acides sulfoniques peut être de toute nature, notamment polyacrylique ou polystyrène. La granulométrie de la résine est avantageusement comprise entre 100 μm et 900 μm , de préférence entre 200 et 750 μm , encore plus préférentiellement entre 250 et 600 μm . La résine utilisable selon l'invention doit préférentiellement présenter une densité supérieure à 1,15.

Parmi les résines commercialement disponibles utilisables dans la présente invention, on peut citer notamment : la résine Trisacryl SP ® commercialisée par la société BIOSEPPRA, la résine MacroPrep High S ® commercialisée par la société BioRad. De préférence, on choisit une résine polystyrène greffée par des fonctions alkyl ou aryl sulfonate.

La résine est conditionnée dans une colonne avant son utilisation, de façon connue de l'homme du métier, par traitement par une solution désinfectante et rinçage afin d'éviter la contamination par des micro-organismes. Elle est ensuite éventuellement équilibrée par passage d'une solution tampon et rinçage.

L'étape b) de fixation de la matière première, lait ou lactosérum, stérile et dégraissée, se déroule dans les conditions préférentielles suivantes :

La résine est conditionnée dans une colonne dont la température est maintenue entre 2 et 15°C, préférentiellement entre 4 et 12°C. Préférentiellement, la colonne est alimentée en matière première par le bas. Avantageusement on travaille en lit fluidisé. De préférence les paramètres de fixation sont ajustés de façon à ce que l'une ou plusieurs des conditions suivantes soient vérifiées :

- BV_f est compris entre 80 et 150, préférentiellement entre 80 et 120 ;
- SV_f est compris entre 5 et 40 h^{-1} , préférentiellement entre 8 et 20 h^{-1} , encore plus préférentiellement entre 8 et 15 h^{-1} ;

- LV_f est compris entre 3 et 4,8 m/h, préférentiellement entre 3,2 et 4 m/h.

De façon préférentielle, l'ensemble des conditions suivantes est vérifié au cours de l'étape b) :

- 5
- BV_f est compris entre 80 et 120 ;
 - SV_f est compris entre 8 et 15 h^{-1} ;
 - LV_f est compris entre 3 et 4,8 m/h.

au cours de l'étape c) :

- 10
- BV_e est compris entre 3 et 7
 - LV_e est inférieur à 1 m/h.

Par l'échange d'ions, les protéines de la fraction laitière utilisée comme produit de départ viennent se fixer sur les fonctions acides de la résine. Le choix des paramètres de fixation selon l'invention permet d'opérer une fixation sélective des protéines sur la colonne. Dans des conditions classiques de fixation du lait sur une résine cationique, 15 la lactoferrine et la lactoperoxydase, majoritaires, se fixent préférentiellement sur la résine. Dans le procédé selon l'invention, les autres protéines, minoritaires, sont favorisées par les conditions de fixation définies ci-dessus et leur proportion dans le mélange de protéines fixées sur la résine est significativement supérieure à leur proportion dans le produit de départ. Le procédé selon l'invention permet ainsi d'isoler une fraction laitière ayant une 20 composition en protéines nouvelle par rapport aux compositions protéiques laitières de l'art antérieur et présentant des propriétés biologiques intéressantes.

L'étape c) d'élution des protéines fixées, se déroule dans les conditions préférentielles suivantes :

La résine est maintenue à une température comprise entre 2 et 15°C, 25 préférentiellement entre 4 et 12°C. Préférentiellement, la colonne est alimentée en matière première (solution aqueuse salée) par le haut. La solution aqueuse saline employée pour la mise en œuvre de l'invention est généralement une solution d'un chlorure d'un métal alcalin tel que K^+ , Na^+ , Ca^+ , Mg^+ . De préférence on emploie une solution aqueuse de chlorure de sodium. Avantagusement, la solution aqueuse de sel a une concentration comprise entre 2 30 et 25%, préférentiellement de 5 à 15% en poids de sel par poids de liquide. De préférence, la force ionique de la solution aqueuse de sel est comprise entre 1 et 2 M. Le pH de la solution d'élution est généralement compris entre 6 et 7, avantagusement entre 6,5 et 7.

De préférence les paramètres d'élution vérifient l'une ou plusieurs des conditions suivantes :

- BV_e est compris entre 3 et 7 et préférentiellement entre 3 et 5 ;

- LV_e est inférieur à 0,5 m/h.

De façon connue, la colonne de résine est lavée avant une nouvelle utilisation.

5 Après cette étape, l'éluat obtenu contenant le mélange de protéines de lait est soumis de façon connue à une ou plusieurs étapes d'ultrafiltration et de diafiltration destinées à éliminer les sels. D'autres moyens connus de l'homme du métier tels que l'électrodialyse ou le passage sur des résines anioniques et cationiques faibles peuvent être employés dans cette étape en remplacement de l'ultrafiltration et de la diafiltration. De
10 préférence, ce traitement est effectué jusqu'à l'obtention d'un perméat ayant une conductivité inférieure à 15 mS. Tout autre procédé permettant d'éliminer les sels, comme notamment l'électrodialyse, peut être utilisé en remplacement de cette étape. La solution est alors soumise à une microfiltration destinée à stériliser le rétentat d'ultrafiltration avant séchage. D'autres moyens techniques peuvent être employés pour stériliser la fraction
15 laitière obtenue à cette étape, notamment un traitement thermique adapté, des ultrasons ou des champs électriques pulsés.

 Préférentiellement, le produit dessalé et stérilisé est séché de façon à obtenir la fraction laitière issue du procédé de l'invention sous forme d'une poudre, ce qui permet ensuite son conditionnement et son stockage. De façon connue, le séchage peut être
20 fait par lyophilisation ou par atomisation.

 La fraction protéique laitière, préférentiellement issue du lait de vache et obtenue par le procédé selon l'invention est nouvelle. Sous forme sèche, elle est caractérisée en ce qu'elle est dotée :

- 25 - d'une teneur en protéines supérieure à 90%,
- d'une teneur en sels minéraux inférieure à 1%,
- d'une teneur en matières grasses inférieure à 1%,
- d'une teneur en lactose inférieure à 1%,
- d'une teneur en humidité inférieure à 5%,
- d'une teneur en lactoferrine inférieure à 80%,
- 30 - d'un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,5,
- d'une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$.

- d'au moins 1% de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8, les pourcentages étant donnés en poids par rapport au poids de matière sèche de la fraction laitière selon l'invention.

Dans le cas où le produit de départ utilisé est du lait et non un lactosérum, le produit obtenu par le procédé de l'invention se caractérise par les conditions supplémentaires :

- présence d'au moins 40% de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8,

- la teneur en lactoferrine est supérieure à 30% et inférieure à 80%,

- l'activité lactoperoxydase est supérieure ou égale à 120 unités ABTS par mg d'isolat (ABTS=2,2'-Azino-bis-(3-éthyl Benzo Thiazoline 6-Sulfonic Acid).

La mesure de DO à 412 nm donne une évaluation quantitative de la lactoferrine et de la lactoperoxydase présentes dans la fraction protéique laitière.

La mesure de DO à 280 nm donne une évaluation quantitative de la totalité des protéines présentes dans la fraction protéique laitière.

Le ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$ montre que la lactoferrine et la lactoperoxydase sont sous-représentées par rapport aux autres protéines dans la composition selon l'invention par comparaison avec les proportions dans lesquelles elles sont présentes dans le lait et dans les fractions protéiques laitières de l'art antérieur.

De préférence, la fraction protéique laitière obtenue par le procédé selon l'invention répond au moins à l'une des caractéristiques suivantes :

- une teneur en protéine supérieure à 95%,

- une teneur en sels minéraux inférieure à 0,5%,

- une teneur en matières grasses inférieure à 0,5%,

- une teneur en lactose inférieure à 0,5%,

- une teneur en humidité inférieure à 4%,

- un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,2,

- une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,1$.

- contient au moins 1% de protéines ayant un point isoélectrique compris entre 8,2 et 8,7.

Dans le cas où le produit de départ utilisé est du lait et non du lactosérum, le produit obtenu par le procédé de l'invention se caractérise par la condition préférentielle additionnelle :

- la teneur en lactoferrine est supérieure à 50% et inférieure à 80%.

Les fractions protéiques laitières selon l'invention présentent des propriétés avantageuses : notamment elles favorisent la croissance des cellules ostéoblastiques et celle des cellules intestinales.

5 Les fractions protéiques laitières de l'invention sont également efficaces pour inhiber la croissance des ostéoclastes et des pré-ostéoclastes.

Ces propriétés ainsi que les propriétés déjà connues des fractions protéiques laitières de l'art antérieur permettent d'envisager l'utilisation de ces compositions dans de nombreuses applications, notamment dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. L'invention a donc également pour objet toute composition alimentaire, pharmaceutique et tout produit d'hygiène comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention.

10 Une composition alimentaire selon l'invention pourra par exemple être un lait alimentaire, en particulier un lait destiné à l'alimentation infantile, obtenu par simple réhydratation de la poudre de fraction protéique laitière selon l'invention. L'invention a donc pour objet l'utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'invention pour la préparation d'un lait alimentaire.

20 L'invention a également pour objet des compositions alimentaires comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention et d'autres ingrédients alimentaires. On peut en particulier envisager d'ajouter la fraction protéique laitière selon l'invention à un lait de vache afin d'enrichir celui-ci en certaines protéines. La présence de calcium dans les aliments comprenant la fraction protéique laitière selon l'invention sera particulièrement bénéfique dans la mesure où cette fraction protéique laitière améliore l'absorption du calcium par l'organisme humain, notamment la fixation du calcium dans le tissu osseux.

25 L'invention a donc également pour objet l'association d'une fraction protéique laitière selon l'invention avec du calcium.

L'invention porte également sur les kits alimentaires comprenant plusieurs constituants conditionnés de façon isolée, destinés à une préparation extemporanée de l'aliment et comprenant de la poudre de fraction protéique laitière selon l'invention.

30 De tels aliments peuvent être utilisés pour la prévention de pathologies telles que : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales, déficience de la barrière intestinale ...

Une composition pharmaceutique selon l'invention, comprenant au moins une fraction protéique laitière selon l'invention et un support pharmaceutiquement acceptable peut être utilisée dans le traitement d'une ou plusieurs des pathologies suivantes : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales, déficience de la barrière intestinale ...

Bien entendu une telle composition peut en outre comporter un ou plusieurs autres actifs thérapeutiques. Du calcium peut avantageusement être associé à la fraction protéique laitière selon l'invention. Une telle association fait partie de la présente invention. En effet, une fraction protéique laitière selon l'invention permet d'améliorer l'absorption du calcium dans l'organisme, notamment la fixation du calcium dans le tissu osseux, ce qui permet d'améliorer l'effet renforçateur des os.

Du calcium avec la vitamine D peut aussi avantageusement être associé à la fraction protéique laitière selon l'invention. Une telle association fait aussi partie de la présente invention. En effet, la vitamine D améliore l'absorption intestinale du calcium et une fraction protéique laitière selon l'invention permet d'améliorer la fixation du calcium dans le tissu osseux. Cet effet synergie permet particulièrement d'améliorer la santé des os.

Des compositions pharmaceutiques ou des compléments alimentaires selon l'invention peuvent être administrés sous toute forme appropriée telle que sous forme de poudre, de granulés, de comprimés, de gélules, de boisson, comme par exemple en solution ou en sirop. La fréquence d'administration et la dose à administrer sont adaptés de façon connue en fonction du poids et de l'âge de l'individu.

Sont également incluses dans la présente invention, les produits d'hygiène, notamment les produits destinés à l'hygiène de la cavité buccale, tels que les dentifrices sous forme de gel ou de pâte, les bains de bouche, les gommes à mâcher, comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention.

EXEMPLES :

I- Préparation des isolats de protéines de lait

Conditions générales :

La résine employée dans les exemples ci-dessous est une résine Trisacryl SP ®. Elle subit les traitements de conditionnement suivants avant sa mise en œuvre initiale : mise en contact avec une solution aqueuse à 0,4% du désinfectant ASEPTO ®, à raison de 3 litres de désinfectant par kilo de résine humide, suivie d'un rinçage. Mise en équilibre par passage d'un tampon acétate (80 mM, pH=5,3) contenant du chlorure de calcium (33 g/l) et du chlorure de potassium (50 g/l), à raison de 4 litres de ce tampon par

kilo de résine humide. Enfin la résine est rincée à l'eau jusqu'à l'obtention d'un éluat ayant un pH compris entre 6 et 7 et une conductivité inférieure à 5 mS.

Après chaque séquence de fixation de matière première et d'élution, la résine est nettoyée par traitement enzymatique à la protéase alcaline de *Bacillus licheniformis* en tampon à pH=8, à 60°C pendant 2 heures, puis traitement par une solution de NaCl à 100g par litre pendant trente minutes (répété 2 fois). Avant sa réutilisation, elle est soumise au traitement de conditionnement exposé ci-dessus.

L'ultrafiltration est effectuée sur l'éluat à une température comprise entre 5 et 10°C sur des membranes organiques dont le seuil de coupure est de 10kD. Le facteur de concentration volumique pratiqué est compris entre 10 et 60, de façon à obtenir un rétentat ayant l'extrait sec le plus élevé possible, de préférence entre 15 et 20%. La diafiltration est effectuée à une température comprise entre 15 et 25°C sur les mêmes membranes, en utilisant un volume d'eau déminéralisée compris entre 8 et 10 fois le volume de rétentat obtenu à l'issue de l'ultrafiltration jusqu'à atteindre une conductivité du perméat inférieure à 15mS.

La microfiltration est effectuée à 35°C à partir du rétentat issu de l'ultrafiltration /diafiltration sur des membranes céramiques de seuil de coupure de 1,4 µm.

Le séchage du perméat de microfiltration est effectué sur une tour d'atomisation à turbines avec une température d'entrée de 140°C et une température de sortie de 80°C.

Caractéristique de la résine :

La résine SPEC 70 est constituée d'un support chimiquement inerte et mécaniquement résistant.

Chimiquement, le support est fabriqué par polymérisation d'AMPS : 2-acrylamide 2-méthyl propane sulfonic acid. La résine a une capacité d'échange d'ions entre 400 et 700 µE/ml et une capacité de fixation protéique mesurée sur la lactoferrine (minimum 20 mg/ml) ou la lactoperoxydase (minimum 40 mg/ml) ou le lysozyme (minimum 70 mg/ml) ; sa densité est supérieure à 1,15 et sa granulométrie se situe entre 250 et 560 µm.

Exemple 1 :

300000 litres de lait écrémé et traité thermiquement à 68°C pendant 15 secondes, sont passés à 10°C sur 3000 litres de résine échangeuse de cations (Référence SPEC 70 fournie par la Société BIOSEPRA) à un débit de 14000 litres /h en flux ascendant dans deux colonnes fonctionnant en parallèle et ayant chacune un rayon de 1 mètre.

Les protéines fixées sur le résine sont éluées par 9000 litres d'une solution de chlorure de sodium à 10% en flux descendant.

L'éluat obtenu présente un pH de 6,5 et une extrait sec de 80 g/kg. Il est passé sur membranes d'ultrafiltration de seuil de coupure de 10 kD et de 17 m² de surface
5 fournies par DSS, à 11°C avec un flux de perméation de 161/h/m² jusqu'à obtenir un facteur de concentration volumique de 7.

Le rétentat a un pH de 5,9 et un extrait sec de 170 g/kg ; afin d'éliminer le sel, ce rétentat est ensuite diafiltré sur les mêmes membranes à 25°C avec de l'eau à hauteur de 70% du volume d'éluat mis en œuvre et jusqu'à obtenir un facteur de
10 concentration volumique de 9,5 en final avec un flux de perméation de 161/h/m².

Le rétentat diafiltré a un pH de 6,5 et un extrait sec de 95 g/kg ; il est alors passé sur membranes de microfiltration de porosité de 1,4 µm à 30°C avec un flux de perméation de 320 l/h/m². Le perméat de cette microfiltration présente un pH de 6,6 et un extrait sec de 75 g/kg.

15 Ce perméat est ensuite séché sur une tour d'atomisation munie d'une turbine ; la température d'entrée en tour est de 140°C et la température de sortie est de 80°C.

L'isolat poudre ainsi obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- Humidité : 4,7%,
- 20 - Protéines (Nx6,38) : 96,2% dont :
 - Lactoferrine : 54%
 - Lactoperoxydase : 125 unité ABTS/mg
- Cendres : 0,1% dont :
 - Na : 0,02%
 - 25 Cl : 0,44%
- Pureté spectrophotométrique : $DO^{412}/DO^{280} = 0,06$,

Le profil électrophorétique obtenu par isofocalisation avec révélation au nitrate d'argent est illustré par la figure 1. Sur la figure 1 on compare la répartition des points isoélectriques de la fraction protéique laitière selon l'invention (notée LN06) et un
30 produit de référence noté Std qui est un kit de calibration protéique commercialisé par la Société Pharmacia sous la référence 17047101 et dénommé « Isoelectric Focusing Calibration Kit Broad PI 3-10 ». On constate que sont majoritairement présentes des protéines ayant des points isoélectriques élevés (autour de 8,4). Ce produit comporte environ 50% en poids de lactoferrine par rapport au poids total de l'isolat.

Exemple 2 :

4,4 litres de sérum acide natif de caséinerie (pH 4,7, extrait sec 65 g/kg) sont passés à 10°C sur 22 ml de résine échangeuse de cations (Référence SPEC 70 fournie par la Société BIOSEPRA) à un débit de 400 ml/h en flux descendant dans une colonne
5 ayant un diamètre de 15 mm.

Les protéines fixées sur la résine sont éluées par 90 ml d'une solution de chlorure de sodium à 10% en flux descendant.

Afin d'éliminer le sel, l'éluat obtenu (100 ml) est ensuite dialysé contre de l'eau déminéralisée pendant 48 heures à 4°C.

10 Le produit dialysé présente les caractéristiques suivantes :

- Extrait sec : 1,5 g/kg,
- pH : 5,4,
- Conductivité : 24 μ S,
- $DO^{412} < 0,005$,
- 15 - $DO^{280} = 4,6$ (0,46 dilué 10 fois).

Le profil électrophorétique permet de constater qu'au moins 1% des protéines présentes ont un point isoélectrique supérieur ou égal à 8. Ce produit contient environ 3% de lactoferrine en poids par rapport au poids total de l'isolat de protéines.

II- Tests biologiques

20 A- Méthodes générales

1. Tests de prolifération des cellules MC3T3 (lignée cellulaire ostéoblastique)

Les cellules MC3T3 sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est de l' α -MEM (alpha-Modified Eagle Medium) supplémenté à l'aide de 10% de sérum de veau fœtal et de 50 U/ml de pénicilline et 50 μ g/ml
25 streptomycine.

Pour tester l'effet des différentes protéines sur la croissance cellulaire, les cellules sont ensemencées sur plaques 48 puits à une densité de 5×10^4 cellules/cm². 48 heures après ensemencement, les protéines sont ajoutées aux cellules. Les solutions protéiques sont préparées dans le milieu de culture à une concentration de 10 mg/ml puis filtrées sur filtre
30 0.22 μ et diluées à la concentration désirée dans le milieu de culture juste avant usage. Les cellules sont dénombrées après 72h de culture en évaluant la quantité d'ADN.

2. Tests de prolifération des cellules RAW 264.7 (lignée cellulaire pré-ostéoclastique)

Les cellules RAW 264.7 sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Dabelcco's Modified Eagle Medium) contenant 25 mM de glucose, 4 mM de glutamine et 1.5 g/litre de bicarbonate supplémenté à l'aide de 10% de sérum de veau fœtal et de 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml streptomycine.

Pour tester l'effet des différentes protéines sur la croissance cellulaire, les cellules sont ensemencées sur plaques 48 puits à une densité de 5×10^4 cellules/cm². 48 heures après ensemencement, les protéines sont ajoutées aux cellules. Les solutions protéiques sont préparées dans le milieu de culture à une concentration de 10 mg/ml puis filtrées sur filtre 0.22µ et diluées à la concentration désirée dans le milieu de culture juste avant usage. Les cellules sont dénombrées après 72 heures de culture en évaluant la quantité d'ADN.

3. Test de prolifération des cellules Caco-2 (lignée cellulaire intestinale)

Les cellules Caco-2 sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Dabelcco's Modified Eagle Medium) contenant 25 mM de glucose supplémenté à l'aide de 15% de sérum de veau fœtal, d'1% d'acides aminés non essentiels, de 6 mM glutamine et de 50U/ml de pénicilline et 50µg/ml streptomycine.

Pour tester l'effet des différentes protéines sur la croissance cellulaire, les cellules sont ensemencées sur plaques 48 puits à une densité de 4×10^4 cellules/cm². 48 heures après ensemencement, les protéines sont ajoutées aux cellules. Les solutions protéiques sont préparées dans le milieu de culture à une concentration de 10 mg/ml puis filtrées sur filtre 0.22µ et diluées à la concentration désirée dans le milieu de culture juste avant usage. Les cellules sont dénombrées après 72h de culture en évaluant la quantité d'ADN.

B- Résultats

Les tests décrits ci-dessus ont été mis en œuvre sur trois produits :

- un isolat de protéines de lait de vache composé à 90% de lactoferrine

30 (Produit témoin) :T₁,

- un isolat de protéines de lait de vache dont la teneur en lactoferrine est de moins de 0,01% (Produit témoin) :T₂,

- le produit préparé à l'exemple 1 : P₁,

- le produit préparé à l'exemple 2 : P₂.

Les résultats de ces tests sont exposés dans le tableau I :

Produit	Concentration	Stimulation de la prolifération des cellules MC3T3	Inhibition de la prolifération des cellules RAW 264.7	Stimulation de la prolifération des cellules Caco-2
T1	1.0 mg/ml	+65%	-70%	+67%
	0.1 mg/ml	+37%	-30%	+40%
T2	1.0 mg/ml	+9%	-8%	+9%
	0.1 mg/ml	+6%	-4%	-
P1	1.0 mg/ml	+36%	-70%	+40%
	0.1 mg/ml	+15%	-22%	+30%
P2	1.0 mg/ml	+31%	-32%	+41%
	0.1 mg/ml	+6%	-17%	+37%

5

TABLEAU I

La concentration désigne la concentration de l'isolat de protéines de lait dans le milieu de culture.

10 L'état de l'art tend à démontrer que l'activité d'un isolat de protéines de lait est liée au pourcentage de lactoferrine qu'il contient (voir résultats de T₂).

Contrairement à ce préjugé de l'art antérieur, les résultats des tests exposés ci-dessus montrent que des isolats de protéine de lait de l'invention, bien que contenant peu de lactoferrine par rapport au témoin T₁, présentent une activité remarquable dans les tests de croissance cellulaire sur des ostéoblastes et sur des cellules intestinales et
15 d'inhibition de la prolifération des pré-ostéoclastes.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un
5 lactosérum comportant les étapes suivantes :

a) le lait ou le lactosérum est stérilisé et dégraissé ;

b) la fraction laitière issue de l'étape a) est passée sur une résine
échangeuse de cations conditionnée dans une colonne d'élution ;

10 c) la fraction retenue sur la résine est éluée par une solution aqueuse
salée ;

d) l'éluat résultant de l'étape c) est dessalé et stérilisé.

Ce procédé étant caractérisé en ce que :

α) la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des
fonctions acides fortes ;

15 le paramètre BV désignant le rapport du volume de matière première au
volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre SV désignant le rapport du débit d'alimentation de la
colonne au volume de résine humide dans la colonne,

20 le paramètre LV désignant le rapport du débit d'alimentation de la
colonne à la section de la colonne,

β) au cours de l'étape b), les paramètres de fixation ont les valeurs
suivantes :

- BV_f est compris entre 5 et 400 ;

- SV_f est compris entre 2 et 40 h^{-1} ;

25 - LV_f est supérieur ou égal à 1 m/h et inférieur ou égal à 5 m/h .

γ) au cours de l'étape c), les paramètres d'élution ont les valeurs
suivantes :

- BV_e est compris entre 1,5 et 7 ;

- LV_e est inférieur à 1 m/h.

30 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le produit de
départ est du lait de vache.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le produit de
départ est un lactosérum acide de caséine.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides de $pK_a \leq 2$ ayant une capacité d'échange d'ions comprise entre 200 et 1000 $\mu E/ml$.

5 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la résine est greffée par des fonctions acide sulfonique ou sel de sulfonate.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la résine est greffée par des fonctions propyl sulfonique ou propyl sulfonate.

10 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la granulométrie de la résine est comprise entre 100 μm et 900 μm , de préférence entre 200 et 750 μm , encore plus préférentiellement entre 250 et 600 μm

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que au cours de l'étape b) de fixation de la matière première, une ou plusieurs des conditions suivantes sont remplies :

- 15
- BV_f est compris entre 80 et 150 ;
 - SV_f est compris entre 5 et 40 h^{-1} ;
 - LV_f est compris entre 3 et 4,3 m/h.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les conditions suivantes sont vérifiées

20 au cours de l'étape b) :

- BV_f est compris entre 80 et 120 ;
- SV_f est compris entre 8 et 15 h^{-1} ;
- LV_f est compris entre 3 et 4,8 m/h.

au cours de l'étape c) :

- 25
- BV_e est compris entre 3 et 7
 - LV_e est inférieur à 1 m/h.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que au cours de l'étape b) la résine est conditionnée dans une colonne dont la température est maintenue entre 2 et 15°C,

30 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que au cours de l'étape c) d'élution des protéines fixées, l'une au moins des conditions suivantes est remplie :

- BV_e est compris entre 3 et 5 ;
- LV_e est inférieur à 0,5 m/h.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que au cours de l'étape c) la résine est conditionnée dans une colonne dont la température est maintenue entre 2 et 15°C.

5 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline employée pour la mise en œuvre de l'invention est une solution d'un chlorure d'un métal alcalin choisi parmi K⁺, Na⁺, Ca⁺, Mg⁺.

14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline est une solution aqueuse de chlorure de sodium

10 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline est d'une concentration comprise entre 2 et 25% en poids de sel par poids de liquide.

16. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline a une force ionique comprise entre 1 et 2 M.

15 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse saline d'élution est compris entre 6 et 7, avantageusement entre 6,5 et 7.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le dessalage est fait par ultrafiltration et diafiltration.

20 19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que les traitements d'ultrafiltration et de diafiltration sont effectués jusqu'à l'obtention d'un perméat ayant une conductivité inférieure à 15 mS.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la stérilisation est faite par microfiltration.

25 21. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le produit dessalé et stérilisé est séché de façon à obtenir la fraction laitière issue du procédé de l'invention sous forme d'une poudre.

22. Fraction protéique laitière caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21.

30 23. Fraction protéique laitière, caractérisée en ce qu'elle répond aux caractéristiques suivantes :

- une teneur en protéine supérieure à 90%,
- une teneur en sels minéraux inférieure à 1%,
- une teneur en matières grasses inférieure à 1%,

- une teneur en lactose inférieure à 1%,
- une teneur en humidité inférieure à 5%,
- une teneur en lactoferrine inférieure à 80%,
- un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,5,
- 5 - une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$,
- comporte au moins 1% de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8,

les pourcentages étant donnés en poids par rapport au poids de matière sèche de la fraction laitière selon l'invention.

24. Fraction protéique laitière selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle répond au moins à l'une des caractéristiques suivantes :

- une teneur en protéine supérieure à 95%,
- une teneur en sels minéraux inférieure à 0,5%,
- 15 - une teneur en matière grasse inférieure à 0,5%,
- une teneur en lactose inférieure à 0,5%,
- une teneur en humidité inférieure à 4%,
- une teneur en lactoferrine inférieure à 80%,
- un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,2,
- 20 - une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,1$.
- comporte au moins 1% de protéines ayant un point isoélectrique compris entre 8,2 et 8,7.

25. Fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisée en ce qu'elle est issue du lait de vache.

26. Fraction protéique laitière selon la revendication 25, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 40% de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8.

27. Fraction protéique laitière selon la revendication 25 ou la revendication 26, caractérisée en ce qu'elle comporte une teneur en lactoferrine supérieure ou égale à 30% et une activité lactoperoxydase supérieure ou égale à 120 unités ABTS par mg d'isolat.

28. Fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisée en ce qu'elle est issue d'un lactosérum acide de caséine.

29. Association d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 28 avec du calcium.

30. Association selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre de la vitamine D.

5 31. Composition alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comporte une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30.

32. Kit alimentaires comprenant une poudre de fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30.

10 33. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30, pour la préparation d'un lait alimentaire

34. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30, pour la préparation d'un aliment destiné à la prévention d'une pathologies sélectionnée parmi : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales, 15 déficience de la barrière intestinale.

35. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30 pour la préparation d'un aliment destiné à favoriser la croissance des ostéoblastes et/ou des cellules intestinales et/ou à inhiber la croissance des pré-ostéoclastes.

20 36. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30 et un support pharmaceutiquement acceptable.

37. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou 25 au traitement d'une pathologies sélectionnée parmi : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales, déficience de la barrière intestinale.

38. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30, pour la préparation d'un médicament destiné à améliorer 30 l'absorption du calcium dans l'organisme.

39. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30 pour la préparation d'un médicament destiné à favoriser la croissance des ostéoblastes et/ou des cellules intestinales et/ou à inhiber la croissance des pré-ostéoclastes.

40. Produit d'hygiène caractérisé en ce qu'il comprend au moins une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 22 à 30.

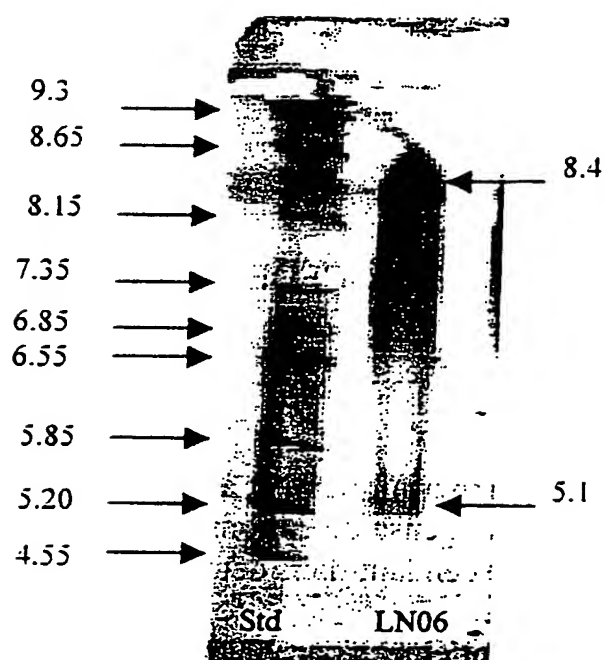


Figure 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02015

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A23J1/20 A23C9/146 A23L1/305 A61K35/20 A61K38/40
 A61K38/17 A61K8/98

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A23J A23C A23L A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, FSTA, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 13676 A (CAMPINA MELKUNIE BV) 22 July 1993 (1993-07-22) cited in the application the whole document ---	1-40
A	US 6 096 870 A (MIRANDA QUIRINUS RONNIE ET AL) 1 August 2000 (2000-08-01) cited in the application the whole document ---	1-40
A	WO 99 15024 A (SEPRAGEN CORP) 1 April 1999 (1999-04-01) cited in the application page 3, line 17 -page 4, line 20; claims 1-36 page 6 -page 11 --- -/--	1-40

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November 2003

Date of mailing of the international search report

04/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Jong, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02015

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 10, 31 October 1996 (1996-10-31) & JP 08 165249 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD), 25 June 1996 (1996-06-25) cited in the application abstract ---	1-40
A	EP 0 704 218 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 3 April 1996 (1996-04-03) cited in the application the whole document ---	1-40
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 11, 28 November 1997 (1997-11-28) & JP 09 187250 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD), 22 July 1997 (1997-07-22) cited in the application abstract ---	1-40
A	EP 1 010 430 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 21 June 2000 (2000-06-21) cited in the application the whole document ---	1-40
A	WO 97 27757 A (AYERS JOHN STEPHEN ;ELGAR DAVID FRANCIS (NZ); PRITCHARD MARK (NZ)) 7 August 1997 (1997-08-07) the whole document ---	1-40
A	HAHN R ET AL: "Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 795, no. 2, 6 February 1998 (1998-02-06), pages 277-287, XP004108665 ISSN: 0021-9673 the whole document ---	1-40
A	CHIU C K ET AL: "Fractionation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane." JOURNAL OF FOOD SCIENCE 1997 DEP. OF FOOD SCI., UNIV. OF WISCONSIN, MADISON, WI 53706-1519, USA, vol. 62, no. 5, pages 996-1000, XP002233814 the whole document ---	1-40
A	FR 2 443 867 A (RHONE POULENC IND) 11 July 1980 (1980-07-11) the whole document ---	1-40
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02015

C.(Continuation) DOCUMENTS CONTAINED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 5 149 647 A (BURLING HANS) 22 September 1992 (1992-09-22) the whole document</p>	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/02015

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9313676	A	22-07-1993	AT 129125 T CA 2128111 A1 DE 69300674 D1 DE 69300674 T2 DK 620709 T3 EP 0620709 A1 ES 2089797 T3 FI 943368 A WO 9313676 A1 NZ 249235 A US 5596082 A	15-11-1995 22-07-1993 23-11-1995 15-05-1996 04-12-1995 26-10-1994 01-10-1996 15-07-1994 22-07-1993 21-12-1995 21-01-1997
US 6096870	A	01-08-2000	US 5756680 A	26-05-1998
WO 9915024	A	01-04-1999	WO 9915024 A1 AU 4589397 A EP 1017286 A1 JP 2001516599 T NZ 503566 A	01-04-1999 12-04-1999 12-07-2000 02-10-2001 25-10-2002
JP 08165249	A	25-06-1996	NONE	
EP 0704218	A	03-04-1996	JP 3112637 B2 JP 8151331 A DE 69529873 D1 EP 0704218 A2 US 5932259 A	27-11-2000 11-06-1996 17-04-2003 03-04-1996 03-08-1999
JP 09187250	A	22-07-1997	NONE	
EP 1010430	A	21-06-2000	JP 11315014 A AU 760503 B2 AU 3536999 A EP 1010430 A1 NZ 502085 A US 6544498 B1 WO 9956762 A1	16-11-1999 15-05-2003 23-11-1999 21-06-2000 26-11-2002 08-04-2003 11-11-1999
WO 9727757	A	07-08-1997	AU 1458497 A CA 2242931 A1 WO 9727757 A1 NZ 326494 A US 6592905 B1	22-08-1997 07-08-1997 07-08-1997 29-11-1999 15-07-2003
FR 2443867	A	11-07-1980	FR 2443867 A1	11-07-1980
US 5149647	A	22-09-1992	SE 458818 B AT 89454 T AU 2718088 A AU 613688 B2 DE 3881217 D1 DE 3881217 T2 DK 124590 A EP 0390821 A1 FI 91032 B JP 2553180 B2 JP 3502921 T NO 902328 A , B,	16-05-1989 15-06-1993 14-06-1989 08-08-1991 24-06-1993 05-01-1994 25-05-1990 10-10-1990 31-01-1994 13-11-1996 04-07-1991 25-05-1990

Information on patent family members

PC/FR 03/02015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date internationale No

PCT/FR 03/02015

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A23J1/20 A23C9/146 A23L1/305 A61K35/20 A61K38/40
A61K38/17 A61K8/98

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A23J A23C A23L A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, FSTA, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 93 13676 A (CAMPINA MELKUNIE BV) 22 juillet 1993 (1993-07-22) cité dans la demande le document en entier ---	1-40
A	US 6 096 870 A (MIRANDA QUIRINUS RONNIE ET AL) 1 août 2000 (2000-08-01) cité dans la demande le document en entier ---	1-40
A	WO 99 15024 A (SEPRAGEN CORP) 1 avril 1999 (1999-04-01) cité dans la demande page 3, ligne 17 -page 4, ligne 20; revendications 1-36 page 6 -page 11 --- -/-	1-40



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 novembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/12/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Jong, E

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No
PC R 03/02015

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 10, 31 octobre 1996 (1996-10-31) & JP 08 165249 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD), 25 juin 1996 (1996-06-25) cité dans la demande abrégé ---	1-40
A	EP 0 704 218 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 3 avril 1996 (1996-04-03) cité dans la demande le document en entier ---	1-40
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 11, 28 novembre 1997 (1997-11-28) & JP 09 187250 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD), 22 juillet 1997 (1997-07-22) cité dans la demande abrégé ---	1-40
A	EP 1 010 430 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 21 juin 2000 (2000-06-21) cité dans la demande le document en entier ---	1-40
A	WO 97 27757 A (AYERS JOHN STEPHEN ; ELGAR DAVID FRANCIS (NZ); PRITCHARD MARK (NZ)) 7 août 1997 (1997-08-07) le document en entier ---	1-40
A	HAHN R ET AL: "Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 795, no. 2, 6 février 1998 (1998-02-06), pages 277-287, XP004108665 ISSN: 0021-9673 le document en entier ---	1-40
A	CHIU C K ET AL: "Fractionation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane." JOURNAL OF FOOD SCIENCE 1997 DEP. OF FOOD SCI., UNIV. OF WISCONSIN, MADISON, WI 53706-1519, USA, vol. 62, no. 5, pages 996-1000, XP002233814 le document en entier ---	1-40
A	FR 2 443 867 A (RHONE POULENC IND) 11 juillet 1980 (1980-07-11) le document en entier ---	1-40
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De — internationale No

P. 03/02015

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>US 5 149 647 A (BURLING HANS) 22 septembre 1992 (1992-09-22) le document en entier -----</p>	1-40

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 03/02015

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9313676	A	22-07-1993	AT 129125 T CA 2128111 A1 DE 69300674 D1 DE 69300674 T2 DK 620709 T3 EP 0620709 A1 ES 2089797 T3 FI 943368 A WO 9313676 A1 NZ 249235 A US 5596082 A	15-11-1995 22-07-1993 23-11-1995 15-05-1996 04-12-1995 26-10-1994 01-10-1996 15-07-1994 22-07-1993 21-12-1995 21-01-1997
US 6096870	A	01-08-2000	US 5756680 A	26-05-1998
WO 9915024	A	01-04-1999	WO 9915024 A1 AU 4589397 A EP 1017286 A1 JP 2001516599 T NZ 503566 A	01-04-1999 12-04-1999 12-07-2000 02-10-2001 25-10-2002
JP 08165249	A	25-06-1996	AUCUN	
EP 0704218	A	03-04-1996	JP 3112637 B2 JP 8151331 A DE 69529873 D1 EP 0704218 A2 US 5932259 A	27-11-2000 11-06-1996 17-04-2003 03-04-1996 03-08-1999
JP 09187250	A	22-07-1997	AUCUN	
EP 1010430	A	21-06-2000	JP 11315014 A AU 760503 B2 AU 3536999 A EP 1010430 A1 NZ 502085 A US 6544498 B1 WO 9956762 A1	16-11-1999 15-05-2003 23-11-1999 21-06-2000 26-11-2002 08-04-2003 11-11-1999
WO 9727757	A	07-08-1997	AU 1458497 A CA 2242931 A1 WO 9727757 A1 NZ 326494 A US 6592905 B1	22-08-1997 07-08-1997 07-08-1997 29-11-1999 15-07-2003
FR 2443867	A	11-07-1980	FR 2443867 A1	11-07-1980
US 5149647	A	22-09-1992	SE 458818 B AT 89454 T AU 2718088 A AU 613688 B2 DE 3881217 D1 DE 3881217 T2 DK 124590 A EP 0390821 A1 FI 91032 B JP 2553180 B2 JP 3502921 T NO 902328 A , B ,	16-05-1989 15-06-1993 14-06-1989 08-08-1991 24-06-1993 05-01-1994 25-05-1990 10-10-1990 31-01-1994 13-11-1996 04-07-1991 25-05-1990

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PC1/FR 03/02015

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)